

Keanekaragaman Sumberdaya Genetik Sayuran Polong Potensial di Indonesia berdasarkan Penanda Molekuler ISSR

Comparative analysis of Genetic Diversity among Pod Vegetables Genetic Resources Potential in Indonesia Revealed by ISSR Markers

Ria Rif'atunidaudina¹, Sobir^{2,3*}, dan Awang Maharijaya^{2,3}

Diterima 06 Maret 2019/Disetujui 21 Oktober 2019

ABSTRACT

Cowpea (*Vigna unguiculata* ssp. *unguiculata*), yard long bean (*Vigna unguiculata* ssp. *sesquipedalis*), Bambara groundnut (*Vigna subterranea*), lima bean (*Phaseolus lunatus*), bush bean (*Phaseolus vulgaris*), jack bean (*Canavalia ensiformis*), velvet bean (*Mucuna pruriens*) and winged bean (*Psophocarpus tetragonolobus*) are the important pod vegetable of the legume crop in Indonesia. These crops have a high economic and nutritional value. Its dry seeds are rich in proteins just like soybeans that can support human health and future food supply. The genetic diversity among different pod vegetables is not very well known. The objectives of this research were to determine the genetic relationships among different pod vegetable species based on ISSR markers. Thirty two accessions were analyzed by 11 ISSR primers. The result showed that the ISSR marker generated 80 DNA band with the polymorphism rate of 100% and the informative primers were PKBT 3 and PKBT 6. The result of cluster and PCA analysis grouped all 32 accessions of the vegetable pod into eight clusters, indicating that the majority of the accession of a given species tend to group. Gower's similarity coefficient among all accessions varied from 0.425 to 0.988, and from 0.444 to 0.700 at the species level. The ISSR markers revealed the close relatedness between *V. subterranea* - *C. ensiformis* species, while the greatest distance was found between the *P. vulgaris* - *M. pruriens* species. Such a determination of relatedness is useful for a better understanding of the relationships among different pod vegetable species, which are generally considered to be a complex group with high phenotypic variability.

Keywords: clustering, genetic distance, polymorphism, pulses, similarity coefficient

ABSTRAK

Kacang tunggak (*Vigna unguiculata* ssp. *unguiculata*), kacang panjang (*Vigna unguiculata* ssp. *sesquipedalis*), kacang Bogor (*Vigna subterranea*), koro kratok (*Phaseolus lunatus*), kacang merah (*P. vulgaris*), koro pedang (*Canavalia ensiformis*), koro benguk (*Mucuna pruriens*) dan kecipir (*Psophocarpus tetragonolobus*) merupakan sayuran polong penting di Indonesia dari tanaman kacang-kacangan. Tanaman tersebut bernilai ekonomi tinggi dan kaya nutrisi dengan kandungan protein biji keringnya yang hampir sama dengan kedelaidan dapat menunjang kesehatan manusia sekaligus menunjang pangan di masa depan. Informasi keragaman genetik di antara sayuran polong yang berbeda masih terbatas. Penelitian ini bertujuan untuk menganalisis keragaman genetik dalam dan antar sayuran polong yang berbeda spesies berdasarkan marka ISSR. Sebanyak 32 aksesi sayuran polong dianalisis menggunakan 11 primer ISSR menghasilkan 80 pita polimorfik dengan persentase polimorfisme sebesar 100% dan primer informatif yang didapat adalah PKBT 3 dan PKBT 6. Hasil analisis kluster dan analisis PCA mengelompokkan 32 aksesi tersebut ke dalam delapan kluster dan menunjukkan mayoritas aksesi yang satu spesies mengelompok bersama. Koefisien kemiripan genetik Gower keseluruhan aksesi berkisar antara 0.425-0.988, dan koefisien kemiripan delapan spesies berkisar antara 0.444-0.700. Hubungan kekerabatan antara spesies *V. Subterranean* - *C. Ensiformis*

¹Mahasiswa Program Studi Pemuliaan dan Bioteknologi Tanaman, Sekolah Pascasarjana, IPB

²Departemen Agronomi dan Hortikultura, Fakultas Pertanian, Institut Pertanian Bogor

Jl. Meranti, Kampus IPB Darmaga, Bogor 16680, Jawa Barat.

³Pusat Kajian Hortikultura Tropika, LPPM Institut Pertanian Bogor

Jl. Pajajaran, Kampus IPB Barangsari, Bogor 16141, Jawa Barat.

E-mail: ridwansobir@gmail.com (*Penulis korespondensi)

memiliki jarak genetik terkecil, sedangkan jarak genetik terbesar ditemukan antara spesies *P. vulgaris* - *M. pruriens*. Penentuan kekerabatan tersebut bermanfaat untuk pemahaman yang lebih lanjut tentang hubungan di antara sayuran polong yang berbeda spesies, yang umumnya dianggap sebagai kelompok yang kompleks dengan variabilitas fenotipik yang tinggi.

Kata kunci: jarak genetik, kacang-kacangan, koefisien kemiripan, pengelompokan, polimorfisme

PENDAHULUAN

Sayuran polong termasuk ke dalam famili Fabaceae (Leguminosae) merupakan *edible legume* yang menjadi komoditas hortikultura. Indonesia sebagai negara yang terletak di kawasan khatulistiwa menjadikannya negara megabiodiversitas, termasuk ke dalam salah satu dari 12 pusat distribusi keanekaragaman genetik tanaman (Dunggio dan Gunawan, 2009), memiliki keanekaragaman sumber daya genetik, salah satunya adalah sayuran polong, seperti buncis, kacang merah (*Phaseolus vulgaris*), kecipir (*Psophocarpus tetragonolobus*), koro karatok (*Phaseolus lunatus*), koro pedang (*Canavalia ensiformis*), kacang panjang (*Vigna unguiculata* ssp *sesquipedalis*) dan kacang tunggak (*Vigna unguiculata* ssp *ungiculata*), kacang Bogor (*Vigna subterranean*), koro benguk (*Mucuna pruriens*) dan komak (*Lablab purpureus*). Sayuran polong adalah komponen keragaman hayati pertanian yang memiliki peranan penting dalam keamanan pangan sumber protein bagi negara berkembang dan sebagai bahan baku industri pangan di negara maju, namun, di Indonesia pemanfaatan sayuran polong masih terbatas pada konsumsi polong muda, sedangkan biji tua (biji kering) belum dimanfaatkan dengan baik.

Biji kering sayuran polong potensial dikembangkan sebagai sumber protein nabati (18.8-50.7%) (Ningombam *et al.*, 2012; Yao *et al.*, 2015), dapat dijadikan pangan fungsional karena memiliki kandungan karbohidrat yang tinggi dengan indeks glikemik yang rendah (Marsono *et al.*, 2002) dan bahan obat-obatan (Dhanasekaran *et al.*, 2008). Selain kandungan nutrisi yang tinggi, tanaman sayuran polong dapat dibudidayakan di lahan-lahan marginal (Gweyi-Onyango *et al.*, 2011; Hall, 2012; Win dan Oo, 2015) dan mampu memproduksi dengan baik karena tanaman sayuran polong umumnya berasal dari daerah tropis dan telah menyebar luas di Indonesia, berbeda dengan kedelai yang berasal dari daerah subtropis sehingga

mengalami kendala rendahnya produktivitas akibat ditanam bukan pada daerah adaptasinya (Nazir *et al.*, 2016).

Keanekaragaman sayuran polong yang melimpah tersebut menjadi hal penting bagi pemulia tanaman sehingga diperlukan informasi keragaman. Informasi keragaman genetik intra dan interspesifik merupakan informasi yang sangat berguna dalam konservasi dan pengelolaan plasma nutfah potensial dalam pengembangan potensi genetik pada program pemuliaan (Ben-Ying *et al.*, 2010) sehingga kuantifikasi keragaman genetik tanaman menjadi sangat berguna. Pendekatan yang dapat dilakukan untuk mendeterminasi keragaman genetik tanaman dapat berdasarkan marka morfologi, biokimia dan molekuler. Studi keragaman genetik pada tanaman legum sebelumnya berfokus pada keterkaitan genetik di antara sejumlah aksesi atau kelompok genotipe spesifik (intraspesifik) menggunakan marka morfologi dan atau molekuler atau perbandingan jenis marka yang berbeda dalam menilai keterkaitan genetik dalam genus tertentu (intragenerik) (Tar'an *et al.*, 2005). Penelitian ini berfokus pada keragaman genetik pada tingkat intraspesifik dan interspesifik tanaman legum yang banyak tumbuh dan potensial di Indonesia menggunakan marka molekuler.

Keragaman genetik berbasis penanda molekuler bukan merupakan produk hasil interaksi antara gen dan lingkungan sehingga mampu menunjukkan keragaman aktual di antara individu yang diamati dan meningkatkan estimasi keragaman genetik tanaman dibandingkan penanda yang berbasis morfologi. *Inter Simple Sequence Repeat* (ISSR) merupakan salah satu penanda molekuler yang menggunakan teknik PCR (*Polymerase Chain Reaction*) berbasis DNA yang mampu memberikan informasi mengenai polimorfisme, hubungan genetik dan keragaman (Anne, 2006). Metode ini banyak digunakan karena tekniknya sederhana, cepat dan murah (Vijayan, 2005; Peng *et al.*, 2014),

menghasilkan pola polimorfisme lebih tinggi daripada RAPD (Gajera *et al.*, 2014), dan telah digunakan untuk analisis keragaman dan hubungan kekerabatan pada populasi intraspesifik, interspesifik dan intergenerik (Singh *et al.*, 2014; Dvořáková *et al.*, 2015). Hasil percobaan Dvořáková *et al.* (2015) melaporkan marka ISSR dapat digunakan untuk mengidentifikasi keragaman genetik pada 69 akses *millet* yang terdiri dari 8 genus.

Informasi keragaman genetik pada tingkat intraspesifik maupun interspesifik memberikan kontribusi positif terhadap proses seleksi tetua persilangan dari spesies yang sama (intraspesifik) atau untuk mengidentifikasi tetua yang paling dekat hubungan kekerabatannya untuk persilangan interspesifik dalam meningkatkan heterosis dan menggabungkan gen yang diinginkan dari latar belakang genetik yang lebih beragam, akan tetapi informasi keragaman genetik di antara spesies sayuran polong yang berbeda masih sangat terbatas. Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi keragaman genetik dan hubungan kekerabatan antar sumber daya genetik sayuran polong menggunakan marka ISSR. Hasil penelitian ini dapat digunakan sebagai informasi awal dalam kegiatan pemuliaan sayuran polong di Indonesia untuk pengelolaan plasma nutfah dan pemilihan tetua potensial.

BAHAN DAN METODE

Analisis molekuler dilakukan di Laboratorium Molekuler Pusat Kajian Hortikultura Tropika (PKHT), Institut Pertanian Bogor, Baranangsiang, Bogor, Jawa Barat pada bulan Agustus 2016 sampai Februari 2017. Materi genetik yang digunakan adalah 8 spesies tanaman legum yang umum dikonsumsi sebagai sayuran polong terdiri dari 32 akses (Tabel 1). Benih dari masing-masing akses ditanam, kemudian saat tanaman berumur 14 HST, pucuk daun dipetik untuk dilakukan isolasi DNA. Isolasi DNA genom menggunakan metode *cetyl trimethyl ammonium bromide* (CTAB) (Agbagwa *et al.*, 2012) dengan beberapa modifikasi penambahan pasir kuarsa dan antioksidan PVP (*polyvinyl pyrrolidone*). Pengujian kualitas DNA dilakukan dengan menggunakan metode

elektroforesis pada gel agarose 0.8% (b/v). Primer yang digunakan untuk amplifikasi DNA adalah 11 primer ISSR yang telah diuji melalui tahap optimasi suhu *annealing* dan polimorfisme antar akses dalam spesies dan beda spesies koleksi PKHT, yakni primer PKBT 1, PKBT 2, PKBT 3, PKBT 4, PKBT 5, PKBT 6, PKBT 7, PKBT 8, PKBT 9, PKBT 10 dan PKBT 12.

Komposisi reaksi PCR (*polymerase chain reaction*) yang digunakan terdiri atas 1 µl DNA *template*, 1 µl primer, 6 µl *go tag green master mix* dan 5 µl *nuclease free water* (air bebas RNase) yang dicampurkan dalam satu *microtube* sehingga total volume PCR mix sebanyak 13 µl, kemudian diamplifikasi menggunakan mesin PCR merk *Applied Biosystem 2720 thermal cycler* dengan tahapan *pre heat* (94 °C, 5 menit), dilanjutkan dengan 35 siklus yang terdiri dari *denaturation* (94 °C, 30 detik), *annealing* (53-54 °C, 1 menit) dan *extension* (72 °C, 1 menit) serta diakhiri dengan *final extension* (72 °C, 5 menit). Produk PCR dielektroforesis pada gel agarose dengan konsentrasi 1.2% dalam 1× buffer TAE selama 47 menit pada tegangan 50 volt. Selanjutnya, agar direndam ke dalam larutan EtBr 1% selama 10 menit kemudian divisualisasi dengan UV transiluminator dan didokumentasikan menggunakan kamera digital dengan merek *Sony DSC Cyber-shot DSC-W570, 16.1 mega pixels, 5x optical zoom*.

Pengamatan pola pita DNA yang dihasilkan menggunakan marka ISSR dilakukan berdasarkan tingkat migrasi yang sama. Nilai 1 apabila terdapat pita dan nilai 0 apabila tidak terdapat pita. Data biner yang terbentuk digunakan untuk analisis gerombol (*cluster analysis*) dan komponen utama (*principal component analysis*). Metode pengelompokan menggunakan metode *average linkage* sedangkan perhitungan koefisien kemiripan metode Gower (Kaufman dan Rousseeuw, 1990). Perangkat lunak yang digunakan *PBSTAT package "cluster"*. Tingkat keselarasan pengelompokan ditentukan berdasarkan nilai koefisien *agglomerative* yaitu kesesuaian pengelompokan dengan kriteria kuat ($0.71 \leq AC \leq 1.00$), sesuai ($0.51 \leq AC \leq 0.70$), lemah ($0.26 \leq AC \leq 0.50$) dan sangat tidak sesuai ($AC \leq 25$) (Kaufman dan Rousseeuw 1990). Analisis komponen utama menggunakan perangkat lunak MINITAB 16.

Tabel 1. Materi genetik 32 aksesori sayuran polong yang dianalisis

No.	Nama Umum	Aksesori	Spesies	Asal Koleksi	Ketinggian Tempat (m dpl)	Lintang Geografis		
1	Kacang tunggak	VUu1	<i>Vigna unguiculata</i> ssp <i>unguiculata</i>	Socah, Madura, Jawa Timur	6	7°07'46"S		
2		VUu3		Socah, Madura, Jawa Timur	6	112°43'06"E		
3		VUu5		PKHT	252	7°07'46"S		
4		VUu6		PKHT	252	112°43'06"E		
5		VUu7		Jepang		6°35'47"S		
6		VUu8		Benteng, Indragiri hilir, Riau	6	106°48'34"E		
7		VUu9		Ciamis, Jawa Barat	443	6°35'47"S		
8		VUu10		Ciamis, Jawa Barat	443	106°48'34"E		
9		VUu11		PKHT	252	37°07'50"N		
10		VUu12		Ciamis, Jawa Barat	443	137°59'44"E		
11		VUu13		PKHT	252	0°39'34"S		
12		VUu14		Ciamis, Jawa Barat	443	103°06'54"E		
13		VUu15		PKHT	252	7°33'05"S		
14		VUu16		PKHT	252	108°09'43"E		
15		Kacang panjang		VUs1	<i>Vigna unguiculata</i> ssp <i>sesquipedalis</i>	Bogor, Jawa Barat	182	7°33'05"S
16				VUs2		Madura, Jawa Timur	6	108°09'43"E
17	VUs3		Labdik Pemuliaan AGH	193		108°09'43"E		
18	VUs4		Labdik Pemuliaan AGH	193		6°35'47"S		
19	Kacang Bogor	VS1	<i>Vigna subterranea</i>	Madura, Jawa Timur	6	106°48'34"E		
20		VS2		Bogor, Jawa Barat	182	6°33'37"S		
21	Koro kratok	PL1	<i>Phaseolus lunatus</i>	PKHT	252	112°43'06"E		
22		PL3		PKHT	252	6°33'19"S		
23	Kacang merah Koro pedang Koro benguk Kecipir	PV4	<i>Phaseolus vulgaris Canavalia ensiformis Mucuna pruriens</i>	Purwakarta, Jawa Barat	105	108°43'44"E		
24		CE2		Plumbon, Cirebon, Jawa Barat	8	7°07'46"S		
25		MP2		Madura, Jawa Timur	6	112°43'06"E		
26		MP3		Bogor, Jawa Barat	182	6°33'37"S		
27		PT1		Madura, Jawa Timur	6	106°43'39"E		
28		PT2		Sumedang, Jawa Barat	520	7°07'46"S		
29		PT3		Klaten, Jawa Tengah	146	112°43'06"E		
30		PT4		PKHT	252	6°48'55"S		
31		PT5		PKHT	252	107°57'05"E		
32		Kedelai		GM	<i>Glycine max</i>	Balitkabi	405	7°38'21"S

HASIL DAN PEMBAHASAN

Analisis dan Profil Penanda Molekuler ISSR

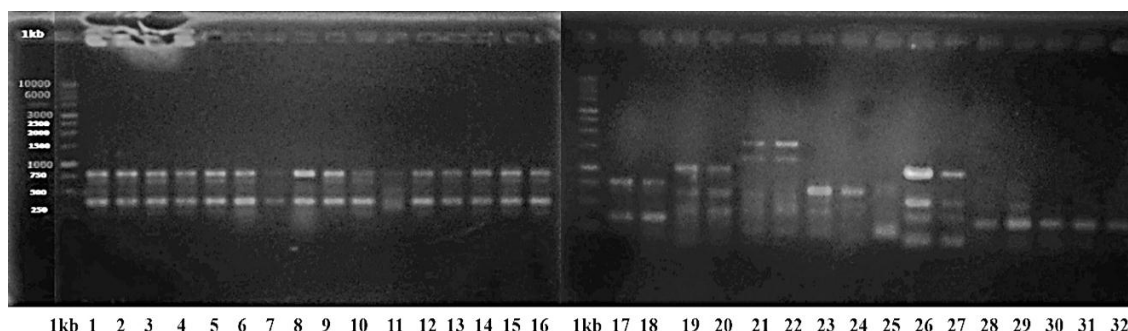
Pada 11 primer ISSR digunakan berhasil mengidentifikasi keragaman dan kedekatan hubungan dari 32 aksesori sayuran polong ditunjukkan dengan munculnya pola pita yang polimorfik. Hal ini berarti primer yang digunakan mampu mengamplifikasi sekuen genom sayuran polong yang diamati dengan menghasilkan pola pita yang bervariasi antar aksesori dan antar primer. Jumlah pita DNA yang dihasilkan sebanyak 80 pita dengan jumlah pita per primer berkisar antara 5-10 pita dengan ukuran berkisar antara >250-2000 pasang basa (Tabel 2). Penentuan ukuran pita DNA didasarkan pada laju migrasi tertentu diurutkan dengan bantuan DNA standar 1 kb *Ladder* (Promega, USA) yang memiliki ukuran mulai dari 250 hingga 10000 pasang basa, sedangkan ISSR adalah marka dominan yang mengamplifikasi fragment DNA yang berukuran 100-3000 pasang basa yang berada di antara dua mikrosatelit (Ng dan Tan, 2015), oleh karena itu, ukuran fragment DNA kurang dari 250 pasang basa tidak dapat ditentukan dengan bantuan DNA standar. Primer PKBT 1 menghasilkan jumlah pita terendah dan primer PKBT 3 menghasilkan jumlah pita terbanyak (Tabel 2). Perbedaan jumlah pita yang dihasilkan disebabkan oleh banyak atau sedikitnya sekuen komplemen dari susunan basa dari primer yang digunakan. Hal ini berarti susunan basa dengan pola (AC)₈TG memiliki sekuens komplemen lebih sedikit

dibandingkan dengan susunan basa yang berpola (AC)₈T pada genom sayuran polong. Primer PKBT 3 dan PKBT 6 merupakan primer informatif karena sekuen primer memiliki banyak kecocokan dengan urutan basa mikrosatelit yang terdapat pada sampel tanaman maupun genom tanaman lainnya, seperti anggrek (Romeida *et al.*, 2012), manggis (Sulassih *et al.*, 2013) dan tarum (Hariri *et al.*, 2017).

Pita polimorfik ditentukan berdasarkan variasi pita yang muncul pada jarak migrasi fragmen DNA yang sama, yakni pita yang berada pada lokus ISSR yang sama. Persentase pita polimorfik pada setiap primer yang digunakan sangat tinggi, yakni 100%. Besarnya persentase pita polimorfik yang dihasilkan diduga dikarenakan jenis sayuran polong yang digunakan memiliki tingkat taksonomi yang bervariasi. Hasil penelitian menunjukkan persentase pita polimorfik pada populasi interspesifik memiliki persentase polimorfis lebih tinggi (Thul *et al.*, 2012) bila dibandingkan dengan populasi intraspesifik (Rana *et al.*, 2014). Menurut Hariri *et al.* (2017) pita polimorfik dapat disebabkan oleh adanya perbedaan jenis tanaman, tingkat takson, jumlah sampel yang dianalisis dan jumlah primer ISSR yang digunakan, oleh karena itu, semakin bervariasi populasi, banyaknya sampel dan primer yang digunakan untuk analisis diduga akan menghasilkan tingkat polimorfisme yang semakin tinggi pula. Gambar 1 mempresentasikan jumlah pita tertinggi yang terbentuk oleh primer PKBT 3.

Tabel 2. Rekapitulasi susunan basa, jumlah pita, persentase pita polimorfik dan ukuran pita hasil amplifikasi DNA 11 primer ISSR pada 32 aksesori sayuran polong

No.	Nama	Sekuen 5'-3'	Annealing (°C)	Jumlah Pita	Pita Polimorfik	Persentase Pita Polimorfik (%)	Ukuran Fragmen (bp)
1	PKBT 1	(AC) ₈ TG	54	5	5	100	>250-2000
2	PKBT 2	(AC) ₈ TT	53	6	6	100	250-1500
3	PKBT 3	(AC) ₈ T	53	10	10	100	<250 - >1500
4	PKBT 4	(AG) ₈ AA	53	7	7	100	<250-1000
5	PKBT 5	(AG) ₈ TA	53	7	7	100	<250-1000
6	PKBT 6	(AG) ₈ TT	53	9	9	100	<250->2000
7	PKBT 7	(GA) ₉ A	53	7	7	100	<250-1000
8	PKBT 8	(GA) ₉ C	54	8	8	100	<250-1000
9	PKBT 9	(GA) ₉ T	54	6	6	100	250-1000
10	PKBT 10	(GT) ₉ A	54	7	7	100	250-2000
11	PKBT 12	(GT) ₉ T	54	8	8	100	500-2000
Total				80	80		
Rata-rata				7.27		100	



Gambar 1. Elektroforegram hasil amplifikasi DNA 32 aksesori sayuran polong menggunakan primer ISSR kode PKBT 3. No 1-14 = VUu (kacang tunggak); No. 15-18 = VUs (kacang panjang); No. 19-20 = VS (kacang Bogor); No. 21-22 = PL (koro kratok); No. 23 = PV (kacang merah); No. 24 = CE (koro pedang); No. 25 = GM (kedelai); 26-27 = MP (koro benguk); No. 28-32 = PT (kecipir).

Keragaman Genetik dan Hubungan Kekerabatan Antar dan Inter Spesies Sumber Daya Genetik Sayuran Polong

Analisis keragaman dan hubungan kekerabatan berbasis penanda molekuler bersifat stabil dan independen dari pengaruh lingkungan dan jaringan serta dapat identifikasi pada tahap awal perkembangan dan menunjukkan perbedaan di level genetik (DNA) (Tar'an *et al.*, 2005). Keragaman genetik dan hubungan kekerabatan 32 aksesori sayuran polong dalam penelitian ini dapat diamati pada tingkat intraspesifik, interspesifik dan intergenerik. Sumber daya genetik sayuran polong yang dianalisis terdiri dari 8 spesies, yaitu (1) *V. unguiculata* yang terdiri dari dua subspecies, yaitu *V. unguiculata* ssp *Unguiculata* (kacang tunggak) dan *V. unguiculata* ssp *Sesquipedalis* (kacang panjang), (2) *V. subterranean* (kacang Bogor), (3) *P. lunatus* (koro kratok), (4) *P. vulgaris* (kacang merah), (5) *G. max* (kedelai), (6) *C. ensiformis* (koro pedang), (7) *M. pruriens* (koro benguk) dan (8) *P. tetragonolobus* (kecipir). Hasil analisis hubungan genetik berdasarkan metode Gower antar 32 aksesori menghasilkan nilai koefisien kemiripan berkisar antara 0.425-0.988 atau jarak genetik antara 0.012-0.575. Pasangan aksesori yang memiliki koefisien kemiripan terbesar adalah aksesori *V. unguiculata* ssp *Unguiculata* (kacang tunggak) No. 1-5 dan 3-12, sedangkan pasangan aksesori yang memiliki koefisien

kemiripan terkecil adalah antara *P. vulgaris* (kacang merah) No. 4 dan *M. pruriens* (koro benguk) No. 2.

Pada tingkat intraspesifik (dalam spesies), nilai koefisien kemiripan sumber daya genetik sayuran polong yang diamati menunjukkan tingkat variasi yang rendah. Koefisien kemiripan spesies *V. unguiculata* berkisar antara 0.838-0.988 dengan jarak genetik terendah adalah pasangan VUu1-VUu5 dan VUu3-VUu12, sedangkan jarak genetik tertinggi adalah pasangan VUu16-VUs1. Spesies *V. subterranean* memiliki koefisien kemiripan sebesar 0.975 (VS1-VS2). Spesies *P. lunatus* (PL1-PL3) dan *M. pruriens* dan (MP2-MP3) sama-sama memiliki koefisien kemiripan sebesar 0.913. Spesies *P. tetragonolobus* memiliki koefisien kemiripan sebesar 0.862-0.975 dengan jarak genetik terendah adalah pasangan PT4-PT4, sedangkan jarak genetik tertinggi adalah pasangan PT1-PT2.

Nilai koefisien kemiripan pada tingkat interspesifik diperoleh dari rata-rata nilai koefisien kemiripan aksesori dari masing-masing spesies. Pada tingkat interspesifik (antar spesies), nilai koefisien kemiripan sumber daya genetik sayuran polong yang diamati juga menunjukkan tingkat variasi yang rendah, yakni berkisar antara 0.444-0.700 dengan jarak genetik terendah adalah antar spesies *P. vulgaris* dengan *M. pruriens*, sedangkan jarak genetik tertinggi adalah antar spesies *C. ensiformis* dengan *V. subterranean*. (Tabel 3).

Tabel 3. Matriks nilai koefisien kemiripan antar 8 spesies sayuran polong yang diamati

Spesies	VU	VS	PL	PV	CE	MP	PT	GM
VU	1							
VS	0.594	1						
PL	0.512	0.600	1					
PV	0.569	0.625	0.669	1				
CE	0.671	0.700	0.631	0.663	1			
MP	0.538	0.606	0.506	0.444	0.631	1		
PT	0.585	0.641	0.609	0.558	0.667	0.686	1	
GM	0.590	0.600	0.606	0.588	0.675	0.544	0.552	1

Keterangan: VU = *V. unguiculata*, VS = *V. subterranea*, PV = *P. vulgaris*, PL = *P. lunatus*, CE = *C. ensiformis*, MP = *M. pruriens*, PT = *P. tetragonolobus* dan GM = *G. max*

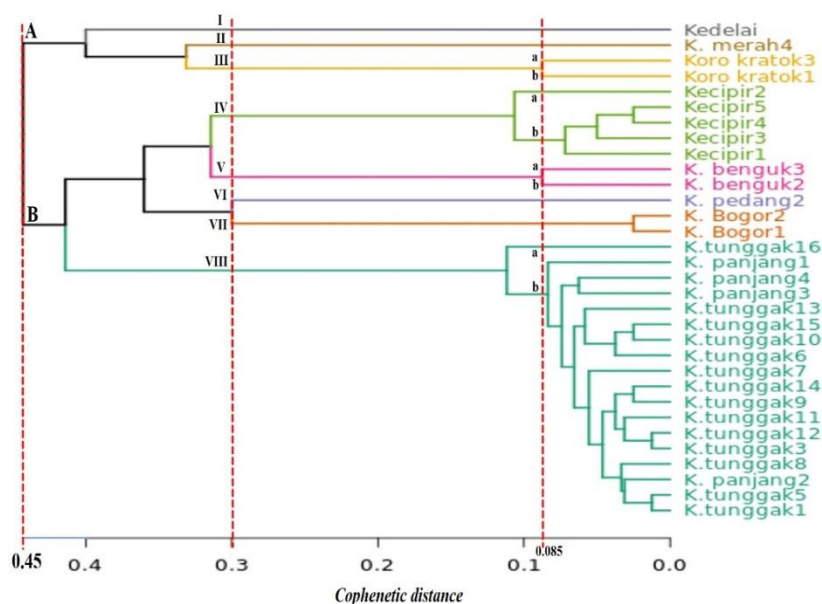
Hasil analisis hubungan genetik pada tingkat interspesifik lebih menunjukkan keragaman yang lebih tinggi dibandingkan pada tingkat intraspesifik. Pada tingkat kemiripan 44.40-70.00% menunjukkan bahwa antar spesies sayuran polong berada pada kelompok yang berbeda, sedangkan pada tingkat kemiripan 91.25-97.50% menunjukkan bahwa antar aksesori dalam spesies yang sama berada pada kelompok yang berbeda. Hal ini diduga dikarenakan pada umumnya spesies pada sayuran polong yang dianalisis merupakan tanaman menyerbuk sendiri dengan tingkat penyerbukan silang yang rendah berkisar antara 1-20% dan persarian terjadi sebelum bunga mekar (kleistogami) (BOSTID, 1981; Vaz *et al.*, 1998; Liu *et al.*, 2014). Meskipun demikian antar spesies sayuran polong yang diamati dapat dikategorikan ke dalam tingkat keragaman yang rendah, yakni kurang dari 40% (Gambar 2). Hal ini diduga dikarenakan sayuran polong yang diamati merupakan *monophyletic group* berdasarkan analisis filogenetik menggunakan lokus DNA kloroplast. Menurut Wojciechowski (2003) dan Stefanovic *et al.* (2009) bahwa genus *Vigna*, *Phaseolus*, *Canavalia*, *Psophocarpus*, *Glycine* dan *Mucuna* termasuk ke dalam taksonomi famili Fabaceae *tribe* Phaseoleae.

Pengelompokkan Sumber Daya Genetik Sayuran Polong

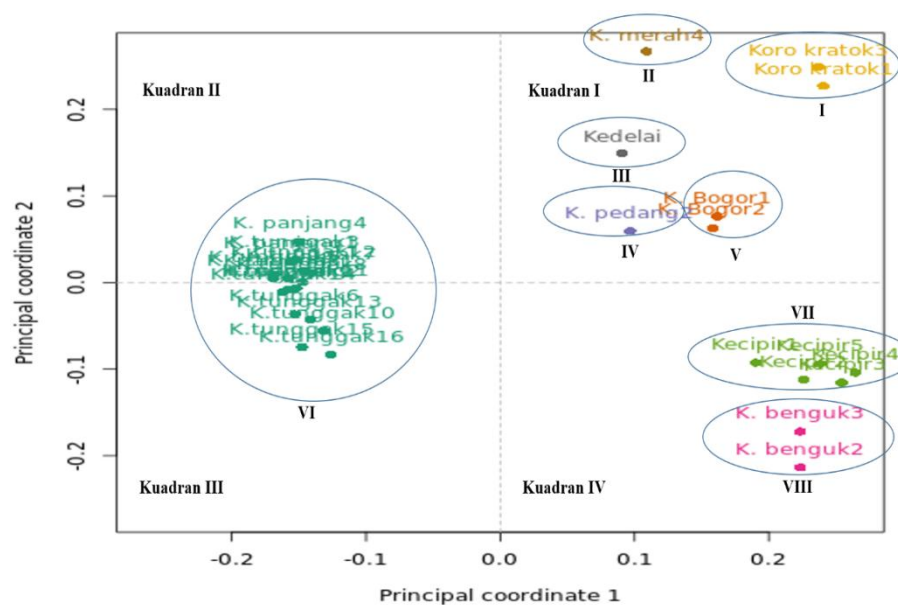
Pengelompokkan suatu koleksi plasma nutfah tanaman dapat dilakukan dengan analisis gerombol dan analisis komponen utama. Teknik analisis gerombol dilakukan dengan menilai keterkaitan dan jarak dari setiap sampel berdasarkan kesamaan maupun perbedaan yang dimiliki antar aksesori. Aksesori yang mengelompok dalam satu kelompok

menunjukkan kemiripan tinggi atau perbedaan jarak genetik yang semakin dekat atau kekerabatan yang semakin dekat (Huda *et al.*, 2017). Berdasarkan hasil analisis gerombol menunjukkan 32 aksesori sayuran polong terbagi ke dalam 2 kelompok utama pada jarak genetik 0.45, yaitu kelompok utama A terdiri atas 4 aksesori meliputi spesies *G. max*, *P. vulgaris* dan *P. lunatus* yang mewakili sayuran polong yang berasal dari daerah subtropika, sedangkan kelompok utama B terdiri atas 28 aksesori meliputi spesies *P. tetragonolobus*, *M. pruriens*, *C. ensiformis*, *V. subterranea* dan *V. unguiculata* yang mewakili sayuran polong yang berasal dari daerah tropika. *G. max* berasal dari Cina, *P. vulgaris* dan *P. lunatus* berasal dari Amerika Selatan dan Amerika Tengah, *P. tetragonolobus* berasal dari Indonesia, *M. pruriens* berasal dari India dan Afrika, *C. ensiformis* berasal dari Meksiko, *V. subterranea* berasal dari Afrika Barat dan *V. unguiculata* ssp *Unguiculata* berasal dari Afrika Barat dan Afrika Timur dan *V. unguiculata* ssp *Sesquipedalis* berasal dari Asia Tenggara (FAO, 2019).

Pada jarak genetik 0.3 menunjukkan 32 aksesori sayuran polong terbagi menjadi 8 kelompok, dimana aksesori-aksesori tersebut secara tegas mengelompok berdasarkan tingkat spesiesnya, sedangkan keragaman aksesori dalam spesies yang sama ditunjukkan pada jarak genetik 0.085 (Gambar 2). Tingkat keselarasan pengelompokkan tersebut yang memiliki nilai koefisien *agglomerative* sebesar 0.82. Hal ini berarti dendrogram pengelompokkan 32 aksesori sayuran polong berdasarkan marka ISSR dalam penelitian ini termasuk kesesuaian pengelompokkan dengan kriteria kuat.



Gambar 2. Dendrogram pengelompokkan 32 aksesori sayuran polong berdasarkan marka molekuler ISSR.



Gambar 3. Diagram pencar KU1 dan KU2 32 aksesori sayuran polong hasil analisis komponen utama menggunakan 80 karakter ISSR.

Pengelompokkan 32 aksesori sayuran polong berdasarkan karakter-karakter molekuler disajikan dalam bentuk diagram pencar melalui analisis komponen utama. Komponen utama (KU) ditentukan berdasarkan nilai akar ciri (*eigenvalue*) > 1. Data karakter yang dapat digambarkan melalui

hasil analisis komponen utama menggunakan 11 primer ISSR hanya sebesar 64.0% dan terdapat tiga komponen utama (KU) dengan nilai proporsi KU1, KU2 dan KU3 masing-masing sebesar 40.90%, 13.80% dan 9.30%. ISSR yang berpengaruh terhadap pembentukan pengelompokkan ditentukan berdasarkan nilai

vektor ciri (*eigenvector*), yaitu berpengaruh (*eigenvector*>0.20) dan berpengaruh signifikan (*eigenvector*>0.61) (Norouzi *et al.*, 2017). Dari 80 karakter ISSR hanya 17 karakter ISSR yang berpengaruh terhadap pengelompokan, meliputi 6 ISSR pada KU1, 7 ISSR pada KU2 dan 4 pada KU3, akan tetapi tidak terdapat ISSR yang berpengaruh signifikan terhadap pembentukan pengelompokan. Primer PKBT9 dengan posisi pita 500 bp dan PKBT5 dengan posisi pita 750 bp memiliki nilai vektor ciri tertinggi 0.28.

Diagram pencar pada Gambar 3 yang dibuat berdasarkan nilai KU1 dan KU2 menunjukkan 32 aksesori sayuran polong tersebar dalam 4 kuadran yang berbeda membentuk 8 kelompok. Pola pengelompokan 32 aksesori sayuran polong hasil analisis komponen utama menunjukkan hasil yang sejalan dengan pola pengelompokan pada dendrogram hasil analisis gerombol, yaitu aksesori dalam satu spesies selalu mengelompok bersama. Spesies *Phaseolus lunatus*, *P. vulgaris*, *G. max*, *V. subterranea* dan *C. ensiformis* mengelompok pada kuadran I memiliki kesamaan ISSR dengan sekuen (AC)₈T berukuran < 750 pb. Spesies *V. unguiculata* ssp *unguiculata* dan ssp *sesquipedalis* mengelompok pada kuadran II dan III memiliki kesamaan ISSR dengan sekuen (AC)₈TT berukuran 1500 pb; (AC)₈T berukuran > 250 pb; (AG)₈AA berukuran < 750 pb, > 250 pb dan < 250 pb; (AG)₈TA berukuran > 250 pb; dan (AG)₈TT berukuran < 200 pb dan 1000 pb; (GA)₉A berukuran < 750 pb dan > 250 pb. Spesies *M. pruriens* dan *Psophocarpus tetragonolobus* pada kuadran IV memiliki ISSR dengan sekuen (AC)₈T berukuran > 250 pb; (AG)₈AA berukuran > 250 pb; (AG)₈TA berukuran > 250 pb. (GA)₉A berukuran > 250 pb; (GA)₉T berukuran 500 pb; dan (GT)₉A berukuran 750 pb.

Persamaan maupun perbedaan pola pita yang dimiliki spesies sayuran kacang bukan berarti lokus ISSR tersebut merujuk langsung pada karakter morfologi tertentu. Walaupun demikian, pengelompokan 32 aksesori sayuran polong menggunakan penanda ISSR yang dianalisis menggunakan analisis gerombol dan analisis komponen utama dapat menunjukkan tingkat keragaman genetik dan hubungan kekerabatan di dalam dan antar spesies sayuran kacang yang berbeda. Lebih lanjut, analisis pengelompokan menunjukkan bahwa aksesori dari suatu spesies tertentu dari sayuran

polong yang diuji cenderung untuk mengelompok bersama, hal ini berarti sumber daya genetik sayuran polong yang diuji bukan merupakan kelompok yang kompleks karena tidak terdapat aksesori yang dari spesies yang berbeda mengelompok bersama sehingga terlihat bahwa terdapat batasan yang jelas antar spesies. Informasi tingkat keragaman genetik dan hubungan kekerabatan yang telah diperoleh ini dapat digunakan sebagai informasi awal untuk memilih tetua yang beragam dari spesies yang sama (persilangan intraspesifik) atau untuk memilih tetua yang paling dekat hubungan kekerabatannya (persilangan intraspesifik) untuk meningkatkan heterosis maupun menggabungkan gen yang diinginkan dari latar belakang yang lebih beragam dalam menghasilkan genotipe elit dalam persilangan. Selain itu, informasi ini dapat juga digunakan untuk mengurangi koleksi aksesori dalam spesies yang memiliki kemiripan tinggi dalam upaya konservasi plasma nutfah.

KESIMPULAN

Hasil penelitian ini menjelaskan pemahaman yang lebih baik tentang hubungan kekerabatan dan keragaman genetik dalam dan antar spesies sayuran polong yang berbeda. Analisis marka ISSR menggunakan 11 primer menghasilkan total pita sebanyak 80 pita DNA dengan polimorfisme yang sangat tinggi yakni 100% dan primer informatif yang didapat adalah PKBT 3 ((AC)₈T) dan PKBT 6 ((AG)₈TT). Marka ISSR ini mengkonfirmasi adanya tingkat keragaman genetik yang rendah atau hubungan kekerabatan yang dekat di antara maupun di dalam spesies sayuran polong yang berbeda. Pada tingkat kemiripan 44.40-70.00% menunjukkan bahwa antar spesies sayuran polong berada pada kelompok yang berbeda, sedangkan pada tingkat kemiripan 91.25-97.50% menunjukkan bahwa antar aksesori dalam spesies yang sama berada pada kelompok yang berbeda. Lebih lanjut, analisis kluster dan analisis komponen utama mengungkapkan bahwa mayoritas aksesori dari suatu spesies tertentu cenderung untuk dikelompokkan bersama yang berarti sayuran polong bukan merupakan kelompok yang kompleks, 32 aksesori sayuran polong tersebut dikelompokkan menjadi 8 kelompok utama

dengan nilai koefisien *agglomerative* atau nilai *goodness of fit matrix correlation* (*r*) mencapai 0.82 menunjukkan kesesuaian pengelompokkan kuat. Pengelompokkan 32 aksesori ini disebabkan oleh variasi dalam jenis dan jumlah aksesori, asal yang berbeda dari aksesori, dan kemampuan beradaptasi dengan kondisi geografis yang berbeda. Sejauh pengetahuan kami, hasil penelitian ini merupakan laporan pertama di mana spesies sayuran polong yang potensial di Indonesia dengan spesies yang berbeda-beda dibandingkan secara bersamaan menggunakan marka ISSR.

Pengamatan ini mengungkapkan pemahaman bahwa aksesori yang memiliki kemiripan secara genetis yang tinggi (hubungan kekerabatan dekat) dapat dilakukan penelitian lebih lanjut dengan melakukan hibridisasi interspesifik untuk menghasilkan varietas tanaman yang lebih baik dengan potensi hasil biji kering yang tinggi, seperti hibridisasi antara kedelai dan koro pedang karena memiliki tingkat kemiripan 67.50%. Sedangkan keragaman intraspesifik yang rendah dapat dilakukan induksi mutasi untuk meningkatkan keragaman dengan memilih aksesori tertentu untuk menghasilkan varietas baru dengan potensi hasil lebih baik, seperti kacang tunggak aksesori VUu12 (biji kering berwarna putih dengan kandungan protein sebesar 22.18%) dan VUu9 (biji kering berwarna hitam dengan kandungan protein sebesar 25.15%) serta kecapi aksesori PT3 (biji kering berwarna kekuningan dengan kandungan protein sebesar 29.43%) yang dapat dimanfaatkan dalam substitusi kedelai dan mengurangi ketergantungan impor kedelai.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih disampaikan kepada Dirjen DIKTI yang telah mendanai penelitian ini melalui Hibah Penelitian Insentif Sistem Inovasi Nasional tahun 2016 atas nama Prof. Dr. Ir. Sobir, M.Si dan kepada Pusat Kajian Hortikultura Tropika IPB University.

DAFTAR PUSTAKA

- Agbagwa, I.O., S. Datta, P.G. Patil, P. Singh, N. Nadarajan. 2012. A protocol for high-quality genomic DNA extraction from legumes. *Genet. Mol. Res.* 11: 4632-4639.
- Anne, C. 2006. Choosing the right molecular genetic markers for studying biodiversity: from molecular evolution to practical aspects. *Genetica.* 127: 101-120.
- Ben-ying, L., L. You-Yong, T. Yi-Chun, W. Li-Yuan, C. Hao, W. Ping-Sheng. 2010. Assessment of genetic diversity and relationship of tea germplasm in Yunnan as revealed by ISSR markers. *Acta Agron. Sin.* 36(3): 391-400.
- [BOSTID] Board on Science and Technology for International Development. 1981. *The Winged Bean: A High-Protein Crop for the Tropics* 2nd ed. National Academy Press, Washington D.C.
- Dhanasekaran, M., B. Tharakan, B.V. Manyam. 2008. Antiparkinson drug – *Mucuna pruriens* shows antioxidant and metal chelating activity. *Phytother Res.* 22: 6-11.
- Dunggio, I., H. Gunawan. 2009. An overview on the history of national park management policy in Indonesia. *J. Anal. Kebijakan. Kehutan.* 6: 43-56.
- Dvořáková, Z., P.H. Cepkova, D. Janovská, I. Viehmannová, E. Svobodová, E.F. Cusimamani, L. Milellac. 2015. Comparative analysis of genetic diversity of 8 millet genera revealed by ISSR markers. *Emirates J. of Food and Agriculture.* 27(8): 617-628.
- [FAO] Food and Agriculture Organization. *View Crop.* <http://ecocrop.fao.org>. [15Oktober2019].

- Gajera, H.P., R.K. Domadiya, S.V. Patel, B.A. Golakiya. 2014. Appraisal of RAPD and ISSR Markers for genetic diversity analysis among cowpea (*Vigna unguiculata* L.) genotypes. J. Crop Sci. Biotech. 17(2): 79-88.
- Gweyi-Onyango, J.P., P. Akwee, C. Onyango, T. Tesfamariam. 2011. Genotypic responses of cowpea (*Vigna unguiculata*) to sub-optimal phosphorus supply in alfisols of Western Kenya: a comparative analysis of legumes. J. Agric Sci. 2(1): 1-8.
- Hall, A.E. 2012. Phenotyping cowpeas for adaptation to drought. Front. Physiol. 3: 1-8.
- Hariri, M.R., T. Chikmawati, A. Hartana. 2017. Genetic diversity of Indigofera tinctoria L. in Java and Madura islands as natural batik dye based on ISSR. J. Math. Fund. Sci. 49(2): 105-115.
- Huda, A.N., W.B. Suwarno, A. Maharijaya. 2017. Genetic diversity of fruit traits among 17 melon genotypes (*Cucumis melo* L.). J. Hort. Indonesia. 8(1): 1-12.
- Kaufman, L., P.J. Rousseeuw. 1990. Finding Groups in Data: An Introduction to Cluster Analysis. John Wiley & Sons Inc, Toronto.
- Liu, M., M. Ding, L. Chen, K. Ouyang, W. Hui, J. Li, X. Chen. 2014. Genetic diversity and relationships among *Canavalia ensiformis* (L.) DC. accessions as revealed by sequence-related amplified polymorphism markers. Biochem. Syst. Ecol. 57: 242-249.
- Marsono, Y., P. Wiyono. 2002. Glycemic index of selected legumes. J. Teknol dan Industri Pangan. 8(3): 211-216.
- Nazir, A., T.K. Suharsi, M. Surahman. 2016. Optimasi produksi dan mutu benih kacang koro pedang (*Canavalia ensiformis* L.) melalui Pengaturan jarak tanam. hal 60-68. Dalam R. Suhartanto, M. Sykur, M. Surahman, S. Ilyas, A. Junaedi, A. Kurniawati, S. Mawiyah, H. Furqoni, F.A. Refra. Prosiding Seminar Nasional dan Kongres Perhimpunan Agronomi Indonesia (PERAGI). Bogor. 27 April 2016.
- Ng, W.L., S.G. Tan. 2015. Inter-simple sequence repeat (ISSR) markers: are we doing it right? ASM Sci. J. 9:30-39.
- Ningomban, R.D., P.K. Singh, J.S. Salam. 2012. Proximate composition and nutritional evaluation of underutilized legume *Psophocarpus tetragonolobus* (L.) DC. grown in Manipur, Northeast India. American J. of Food Technology. 7(8): 487-493.
- Norouzi, E., J. Erfani-moghadam, A. Fazeli, A. Khadivi. 2017. Morphological variability within and among three species of *Ziziphus* genus using multivariate analysis. Sci. Hortic. 222: 180-186.
- Peng, L., M. Ru, B. Wang, B. Li, J. Lu, Z. Liang. 2014. Genetic diversity assessment of a germplasm collection of *Salvia miltiorrhiza* Bunge based on morphology, ISSR and SRAP markers. Biochemical Systematics and Ecology. 55: 84-92.
- Rana, M., R. Sharma, P. Sharma, S.V. Bhardwaj, M. Sharma. 2014. Estimation of genetic diversity in *Capsicum annuum* L. germplasm using PCR-based molecular markers. Natl. Acad. Sci. Lett. 37(3): 295-301.
- Romeida, A., S.H. Sutjahjo, A. Purwito, D. Sukma, Rustikawati. 2012. Genetic variations of *Spathoglottis plicata* Blume. orchid mutants based on ISSR markers. J. Agron. Indonesia. 40(3): 218-224.
- Sing, A., H.K. Dikshit, N. Jain, D. Singh, R.N. Yadav. 2014. Efficiency of SSR, ISSR and RAPD markers in molecular characterization of mungbean and other *Vigna* species. Indian J. of Biotechnology. 13: 81-88.

- Stefanović, S., B.E. Pfeil, J.D. Palmer, J.J. Doyle. 2009. Relationships among phaseoloid legumes based on sequences from eight chloroplast regions. *Syst. Bot.* 34(1): 115-128.
- Sulassih, Sobir, E. Santosa. 2013. Phylogenetic analysis of mangosteen (*Garcinia mangostana* L.) and its relatives based on morphological and ISSR markers. *SABRAO J. of Breeding and Genetics*. 45(3): 478-490.
- Tar'an, B., B. Zhang, T. Warkentin, A. Tullu, A. Vandenberg. 2005. Genetic diversity among varieties and wild species accessions of pea (*Pisum sativum* L.) based on molecular markers, and morphological and physiological characters. *Genome*. 48: 257-272.
- Thul, S.T., M.P. Darokar, A.K. Shasany, S.P.S. Khanuja. 2012. Molecular profiling for genetic variability in *Capsicum* species based on ISSR and RAPD markers. *Mol. Biotechnol.* 51: 137-147.
- Vaz, C.G., D. de Oliveira. 1998. Pollinator contribution to the production of cowpea in the Amazon. *Hort. Science*. 33(7): 1157-1159.
- Vijayan, K. 2005. Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in mulberry genome analysis. *Int. J. Ind. Entomol. Inter.* 10(2): 79-86.
- Win, K.T., A.Z. Oo. 2015. Genotypic difference in salinity tolerance during early vegetative growth of cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.) from Myanmar. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* 4: 449-455.
- Wojciechowski, M.F. 2003. Reconstructing the phylogeny of legumes (leguminosae): an early 21st century perspective. *Advance in Legume Systematics*. 10: 5-35.
- Yao, D.N., K.N. Kouassi, D. Erba, F. Scazzina, N. Pellegrini, M.C. Casiraghi. 2015. Nutritive evaluation of the bambara groundnut Ci12 landrace [*Vigna subterranea* (L.) Verdc. (Fabaceae)] produced in Côte d'Ivoire. *Int. J. Mol. Sci.* 16: 21428-21441.